Prof. E. Bertarelli e Dr. M. Marchelli

Alterazioni della senape alimentare da protei

e intossicazioni da senape alterata

Estratto dalla **Rivista di Igiene e di Sanità pubblica**
Anno XIX — 1908

BIELLA
Stabilimento Tipografico G. Testa
1908.

Prof. E. Bertarelli e Dr. M. Marchelli

Alterazioni della senape alimentare da protei e intossicazioni da senape alterata

---

Estratto dalla **Rivista di Igiene e di Sanità pubblica**
Anno XIX — 1908

BIELLA
Stabilimento Tipografico G. Testa
1908.

Istituto di Igiene della R. Università di Parma
diretto dal Prof. E. Bertarelli

Alterazioni della senape alimentare da protei e intossicazioni da senape alterata (*)

Prof. E. BERTARELLI e Dr. M. MARCHELLI.

La senape alimentare è stata oggetto di numerose sofisticazioni, e tutti i trattati di bromatologia registrano le più importanti, e non mancano del resto memorie pregevoli riassuntive al riguardo. Nei lavori di Griggi (1), Albert S. Leach (2), Hartwich e Vuillemin (3) si trova tutto quanto può interessare lo studioso di questa sostanza.

Per contro assai povera è la letteratura bromatologica intorno ad alterazioni spontanee di questo prodotto. In molti trattati anzi si afferma senz'altro che la senape è un buon disinfettante intestinale, e si attribuiscono ad essa e ai suoi derivati alimentari, delle considerevoli proprietà germicide: il che spiega perchè nessuna disposizione regolamentare esista per la sorveglianza del prodotto, sotto il rapporto delle alterazioni spontanee.

Per quanto riguarda la senape naturale non abbiamo tro-

(*) Le ricerche batteriologiche furono eseguite dal Prof. E. Bertarelli; le chimiche dal Dr. M. Marchelli. — Il lavoro è stato compiuto nel laboratorio di Patologia del Prof. G. Rattone, che per queste e per altre ricerche accordò larga ospitalità. — (Comunicazione fatta alla Società Medica di Parma con dimostrazione di preparati e culture il 21 marzo 1908).

(1) GRIGGI - Sofisticazioni del seme della senape - *Bollett. chim. farm.* - 1898.

(2) ALBERT S. LEACH - Zussamensetzung und Werfälschung von Senpfpulver - *Journ. Amer. Chem. 1904,* riferito in *Zeit. f. Unter. d. Nahrungs u. Genussmittel, 1905, f. 4.*

(3) C. HARTWICH e A. VUILLEMIN - Beiträge zur Kenntnis der Senfsamen - *Apoth. Zeit., 1905.*

vato indicazione alcuna, all'infuori del possibile ammuffimento, il quale in vero, con senape normale, non deve facilmente essere comprensibile.

Più facile deve essere già aprioristicamente la cosa, quando si tratti di senape preparata come alimento, sotto forma di materiale conservabile, e specialmente nella forma di prodotto che i francesi classificano come moutarde diaphane.

In questo caso, l'aggiunta e il trattamento preliminare con acqua, facilitano la scissione del glucoside proprio della senape, il mironato potassico, in glucosio, in solfato acido di potassio, e in solfocianuro d'alile, e scomparso il mironato, al quale spetta in buona parte il potere germicida, scende la conservabilità del preparato alimentare, sebbene i fabbricanti considerino la presenza del solfocianuro d'alile come una garanzia per la buona conservazione.

La quale dovrebbe poi essere resa ancor più sicura per l'aggiunta di aceto (o di acido acetico), che deve essere fatta in certi limiti (3 %).

I fabbricanti di senape devono avere conosciuto tutto questo attraverso all'esperienza di lunghi anni, tanto che in Germania hanno creduto necessario formulare delle norme fisse per la buona preparazione di prodotti conservabili di senape (1).

Ma la moutarde, non ostante tutto ciò, e non ostante la mancanza di indicazione nella letteratura, è un prodotto alterabile.

Nella letteratura non troviamo se non una sola indicazione, molto recente, al riguardo. Lo scorso anno Kassowicz (2) ha osservato dei campioni di moutarde diaphane di marca francese, che presentavano segni evidenti di alterazione.

I vasetti della senape, davano odore sgradevole, rancido e mostravano segni di fermentazione.

Dalle senape in discorso egli isolò due germi; uno che classifica come Bacillus sinapivorax, fluidificante la gelatina, fer-

(1) Normen des Verein Deut. Senffabrikanten - *Zeit. f. öffen. Chemie, 1904, f. 183.*

(2) A. Kassowicz - Die Zersetzung des französischen Senfer durch Bakterien und deren Bekämpfung - *Zeit. Land. Versuchswesen in Oster., 1906,* riferito in *Zeit. für Unter. d. Nahrungs. und Genussm., 1908, Vol. 14.*

mentante il glucosio, capace di sviluppare del gaz dalle senape. Il secondo germe che egli definisce come Bacillus sinapivagus non è capace di fermentare il glucosio, ed a lui spetterebbe l'odore cattivo proprio dei campioni della senape osservata.

Anzi Kassovicz arriva a consigliare anche il rimedio, che consisterebbe nell'aggiunta dell'1/2 - 1 % acido acetico.

Circa i suoi germi, può sorgere qualche sospetto se proprio debbono meritare una classificazione a sè; non abbiamo però potuto leggere in estenso il lavoro, e quindi ogni giudizio è qùi fuori di luogo.

***

I casi che hanno dato occasione a queste ricerche hanno qualche interesse per la questione della conservabilità della senape preparata, e dei pericoli che qualche volta essa può riserbare.

Il 16 di gennaio, e più precisamente dalla famiglia di uno di noi, in un villaggio presso Torino era stato acquistato un vasetto di moutarde diaphane di fabbrica torinese. Aperto il vasetto durante il desinare, fu subito avvertito un odore che non pareva l'abituale odore di questo prodotto.

Si osservò anche una evidente fermentazione della senapa, con presenza di grosse bolle di gaz.

Inoltre la massa della senape al tatto si presentava più soffice del normale, come se il gaz si fosse diffuso e amalgamato alla massa della senape.

Alcuni dei presenti non vollero toccare il prodotto. Uno dei commensali però, attribuendo la fermentazione al turacciolo, e affermando che il gusto era di poco alterato, mangiò in certa quantità la senape stessa. Il che fu pure fatto da una persona di servizio.

Dopo qualche ora, entrambe le persone che avevano mangiato la senape, accusarono dolori di stomaco e malessere generale, acceleramento del polso, cefalea, e il giorno successivo scariche diarroiche. Il malessere e l'abattimento continuarono qualche ora: si intervenne semplicemente con del caffè, visto che l'assieme dei sintomi non era molto inquietante.

Per ragioni ovvie si pensò subito che la causa dei due leggieri casi di avvelenamento dovesse cercarsi nella mostarda; e del resto mancava qualsiasi altra, anche lontana giustificante dei fenomeni.

I lievi fatti di intossicazione non lasciarono nei due colpiti altre traccie. La senape però fu raccolta e di essa si fece oggetto di studio.

All'aspetto essa si presentava di colore normale: soltanto la consistenza tradiva l'avvenuta fermentazione, che si rivelava ancora, dalle numerose bolle di gaz che intersecavano la compagine della senape stessa.

L'odore sgradevole, si allontanava da quello tipico della moutarde diaphane (a la ravigotte: quale era dichiarato la nostra). Oltre al lieve odore acetico di questo prodotto, si aveva impressione di un odore speciale ricordante la salamoia di acciughe alterate, con una tipica punta di rancido.

Al gusto la senape non si presentava del tutto sgradevole: però si sentiva che il sapore naturale era profondamente modificato, se anche non poteva essere facile definire la modificazione stessa.

L'esame microscopico rivelò subito la natura della causa della grave alterazione.

Nei preparati a fresco, allestiti con acqua e con soluto fisiologico, in mezzo a molto materiale amorfo e a taluni lembetti di tessuto, tipici per la senape, si osservarono in quantità notevole dei bastoncini molto rifrangenti, allungati. Tenuto il materiale addizionato di acqua a 37°, ed allestito delle goccie pendenti gli stessi germi a lungo bastoncino, si presentavano nel liquido raccolto sopra la senape sedimentata, e si presentavano mobili.

Gli strisci colorati coi colori comuni, pure rivelavano il germe, il quale — forse per il materiale ambiente ricco di sostanze grasse — non assumeva i colori.

La colorazione riuscì, facendo uso della soluzione fenica Ziehl e mordezando a caldo prima, il preparato con soluto di tannino, al 10 %. In tal modo si colorarono assai bene le forme a bastoncino allungato, sottile, che presentano nei preparati, abbastanza bene evidente, una capsula.

Non si osservarono nella senape altre forme di schizomiceti o di altri viventi inferiori, oltre a questo che si presentava con una abbondanza veramente impressionante.

Il sospetto che ci si trovasse innanzi ad una invasione di protei era quindi naturale.

Si fecero degli isolamenti in molti materiali: agar, agar lattosato e glucosato, agar senape, senape sterile ecc. Ricordiamo subito che gli isolamenti in senape sterile (si erano usate buone senapi francesi) e in agar-senape, furono negativi. Invece nei comuni terreni e in tutti gli isolamenti, si ebbe lo sviluppo di un certo numero di colonie, espanse e a margini digitati, con grande tendenza a distendersi.

Il germe cresceva bene su tutti i terreni e presentava morfologicamente e biologicamente questi caratteri.

Bastoncino da 1,5 a 2,5 μ diritto, a estremi tondeggianti. Non sporifica. Mobilissimo. In brodo non presenta più ben evidente le capsule.

Si colora col Gram.

Colturalmente presenta questi caratteri sommari: in brodo dà intorbidamento uniforme, e in capo a due giorni abbondante sedimento. Cresce in gelatina fluidificandola attivamente. Le colonie isolate in gelatina e in agar si presentano piuttosto spesse, con bordi digitati, con abbondanti propaggini. Per istriscio in agar si ha una patina bianco grigia. Su patata dà una patina prima bianchiccia, poi un po' cupa, con ripiegature; la patina è ricca, non molto aderente alla superficie del terreno.

Non dà nitriti in brodo, non si ha — almeno dopo 2 giorni — formazione di indolo. Non arrossa l'agar laccamuffato-lattosato, e lascia tal quale il siero di latte laccamuffato. Non coagula il latte.

Il germe è quindi uno dei pochi protei resistenti al gram.

Tra le numerose varietà di protei, esso può essere da questi caratteri sommari identificato col Proteus Zenkeri. Noi non ci soffermiamo sulla discussione dei caratteri per la determinazione sistematica: basterà a tal proposito rimandare al

recente lavoro di Klieneberger (1) ove sono raccolti molti dati di interesse per la sistematica di questo gruppo.

Quindi l'alterazione della senape era dovuta ad una invasione di proteo Zenkeri, moltiplicatosi intensamente nella senape stessa.

L'origine del proteo non può essere dubbia. Con molta verosimiglianza il proteo è giunto alla senape col poco di acciuga che si è unito alla moutarde per darle il gusto caratteristico. L'odore stesso rivelava la cattiva condizione della acciuga che si era unita alla mostarda e del resto si sa che con certa frequenza nelle acciughe di pessima qualità possono trovarsi invasioni da protei.

Rimane a spiegare come mai possa questo germe vivere e moltiplicarsi così bene in un prodotto che per sua natura così poco si presta allo sviluppo dei germi, e che generalmente, anzi, si ritiene come un buon disinfettante. La cosa a tutta prima riesce ancor più inesplicabile, se si tien conto che nella preparazione della mostarda dalla comune senape, viene spesso aggiunto dell'aceto.

Perchè l'alterazione sia possibile occorre che la qualità di senape non sia molto ricca di mironato, e che l'aceto aggiunto sia in quantità scarsa, o poco ricco di acido acetico: ma è ben certo che non ostante i dati teorici, nella pratica l'invasione da proteo può presentarsi.

Verificata l'alterazione, fu fatta una certa incetta di campioni di senape preparata, portando l'attenzione su quella che presentava segni sospetti di alterazione. Non fu difficile su alcune dozzine di vasi esaminati, trovarne altri due, le cui caratteristiche di odore e di gusto rivelavano una sicura alterazione.

I due vasetti erano di marca identica a quella primitivamente incriminata. Orbene, in entrambi i vasi, all'esame microscopico si osservarono, non abbondantissimi come nel 1 vaso ma pur sempre in quantità considerevole, dei germi mobili, difficilmente colorabili colle comuni soluzioni coloranti. Alla prova colturale e al successivo differenziamento si potè stabili-

---

(1) C. Klieneberger - Ueber Diefferenzierung pathogenen Proteusarten - *Zeitschrift für Hygiene, 58° Vol., 1° fascicolo.*

re anche in questi due esemplari la presenza dello stesso proteo. Abbiamo anche esaminato varii vasi di marca francese, ma non si trovarono germi.

La constatazione assumeva per ciò un certo interesse. La invasione da proteo è quindi un rarissimo fatto accidentale, ma può presentarsi quando si trovino presenti talune circostanze, che a noi non è dato precisare, ma che con verosimiglianza sono quelle già indicate: senape poco ricca di glucoside e di mirosina e di olio essenziale, scarsa quantità di aceto artificialmente aggiunto.

L'alterazione artificiale col proteo da noi isolato è riuscita su qualche esemplare di senape preparata italiana: è stato negativo il trapianto con senape francese, o almeno colle marche colle quali abbiamo sperimentato.

Ciò dimostra che è possibile avere delle moutardes diaphane al riparo da questi inquinamenti allora quando la preparazione sia ben fatta.

Inoltre il proteo coltivato, male si riadatta a crescere anche su tipi di mostarda identici a quella che presentava la alterazione spontanea: e cioè come sempre in casi analoghi, il germe si è a poco a poco adattato a crescere in un ambiente che non può davvero essere considerato come un ambiente senz'altro adatto per lo sviluppo dei protei: ma trasportato nelle solite condizioni artificiali di sviluppo sui terreni di coltura, perde il suo adattamento al terreno abnorme.

Le senapi sensibilmente acide non si prestano allo sviluppo del proteo: l'aggiunta quindi di una discreta percentuale, (2-3 % di acido acetico, meglio che non dell'aceto, infido per composizione e per azione), appare logica come mezzo di buona conservazione della senape stessa.

*
* *

Ci siamo chiesti quali alterazioni potevano essersi determinate, così da spiegare il lieve avvelenamento osservato nei nostri due casi.

Era naturale pensare alla formazione di ptomaine. La natura del germe isolato, il fatto della presenza di materiale proveniente dalle acciughe, se si vuole gli stessi fenomeni di lie-

ve intossicazione, facevano pensare a ciò. Era impossibile entrare nel quesito se le eventuali ptomaine si fossero formate a spese dei componenti della senape o per caso fossero preformate nella acciuga alterata, unita alla moutarde.

Neppure il tentativo di inquinare a bella posta della senape identica poteva essere esauriente, poichè si comprende che l'identità sarebbe stata solo apparente, e mancava la garanzia che le sostanze impiegate nella preparazione fossero in tutti e due i casi identiche.

Comunque l'ipotesi di presenza di ptomaine era naturale. La ricerca di queste fu fatta complessivamente sul materiale del primo vaso, in parte già consumato, e sugli altri due vasi che presentavano una analoga alterazione.

Per la ricerca fu seguito il metodo Otto, trattando la senape bollita e alcalinizzata (per neutralizzare l'acidità di acido acetico) con alcali concentrato, aggiungendo, secondo le norme, poco acido tartarico sino a reazione acida; scaldando il tutto a 40°-50° a bagno maria per alcune ore, filtrando poi la massa e spremendo quando tutto era freddo.

Si ripetè l'operazione una seconda volta, lavando il residuo solido con alcool. Si evaporò, come di norma, l'alcool non oltre a 50°, e ridotto il liquido a piccolo volume si filtrò; il filtrato fu ridotto a consistenza di estratto. Il residuo fu esaurito con alcool assoluto.

La soluzione alcoolica filtrata si evaporò a bagno maria, si riprese con poca acqua; e la soluzione acquosa fu addizionata di etere, agitando.

Rinnovato così il trattamento etereo, ed esaurita così la soluzione acida con etere, si trattò con bicarbonato sodico agitando sino ad avere nel liquido reazione alcalina. Svaporato l'etere il residuo fu sciolto in acqua.

Si ottiene una soluzione acquosa che filtrata si presenta lievemente gialla.

Sulla soluzione alcalina furono fatti diversi saggi rivelatori delle ptomaine (con cloruro d'oro e con joduro potassico iodurato).

Alle due prove si ebbe un lieve precipitato in quantità evidente, ma così scarso da rendere impossibile uno studio ulteriore analitico.

Si noti che la senape utilizzata per l'estrazione era inizialmente in scarsa quantità (70 gr.), per cui la ricerca non poteva essere condotta più oltre.

Il liquido alcalino fu anche saggiato sugli animali di laboratorio.

Si erano ottenuti 260 cmc. di soluzione alcalina, partendo dai 70 gr. di senape.

Di pochi animali inoculati, si ebbe in un topolino inoculato con 0,2 cm. di liquido nel peritoneo, morte in 32 ore, con fenomeni di contrazioni spastiche. Gli animali inoculati con dosi minori sopravissero.

Il risultato non permette una risposta definitiva: lascia sorgere il sospetto che realmente in queste senapi si siano formate in piccole quantità delle ptomaine, che non abbiamo potuto definire.

Ricordiamo senz'altro che il processo Otto fu pure eseguito su campioni di egual marca di senape normale: nel liquido alcalino non si ebbe alcuna reazione rivelatrice di sostanze tossiche del gruppo delle ptomaine.

Sui campioni di senape furono anche fatte delle determinazioni chimiche, dirette a vedere quali modificazioni eventuali intervenivano nella senape alterata.

Per avere un punto di comparazione della moutarde ben rimescolata fu divisa in due parti uguali, poste in uguali vasi: una fu infettata col proteo isolato dalla senape guasta, l'altra fu tenuta tal quale, ponendo però i 2 vasi nelle stesse condizioni di temperatura e di ambiente.

Sui due campioni furono determinate oltre l'acqua (che non ne interessa), i grassi totali (per estrazione), l'acidità volatile riferita solamente agli acidi grassi volatili, l'acidità totale del grasso estratto e il glucosio.

Ecco i dati comparativi:

	Senape non infetta o/o di sos. umid.	Senape infetta o/o di sos. umid.
Grasso	gr. 4.915	gr. 4.425
Acidità volatile del grasso	5.30	3.66
Acidità totale del grasso	» 0.90	» 1.68
Glucosio	» 2.29	» 2.34

L'acidità volatile è espressa col numero di Reichert, l'acidità totale espressa in acido solforico.

Il confronto di questi dati permette di fare questo rilievo: l'alterazione data dal proteo interessa notevolmente la sostanza grassa, cioè, aumenta sensibilmente l'acidità totale della senape, aumenta pure in limiti alti l'acidità per grassi volatili.

Riassumendo quindi dal punto di vista bromatologico si possono nelle invasioni da proteo descritte, avere formazione di ptomaine in piccola quantità, e alterazioni della parte grassa della senape. Di qui almeno in parte le modificazioni di odore, di gusto e verosimilmente le lievi proprietà tossiche del prodotto alterato.

***

Le considerazioni di carattere igienico che scaturiscono da queste constatazioni possono riassumersi così: la moutarde diaphane può presentare alterazioni spontanee, non prive di inconvenienti, e che nella migliore ipotesi alterano profondamente le caratteristiche gustative della senape.

Quindi è necessario anche su questo prodotto una certa sorveglianza, non illudendoci nel suo presupposto potere germicida e disinfettante.

Il rimedio migliore da adottarsi nella preparazione della moutarde contro le alterazioni future, è l'aggiunta di una certa quantità di acido acetico (1-1 1/2 %) che rende impossibile l'attecchimento e lo sviluppo del proteo.